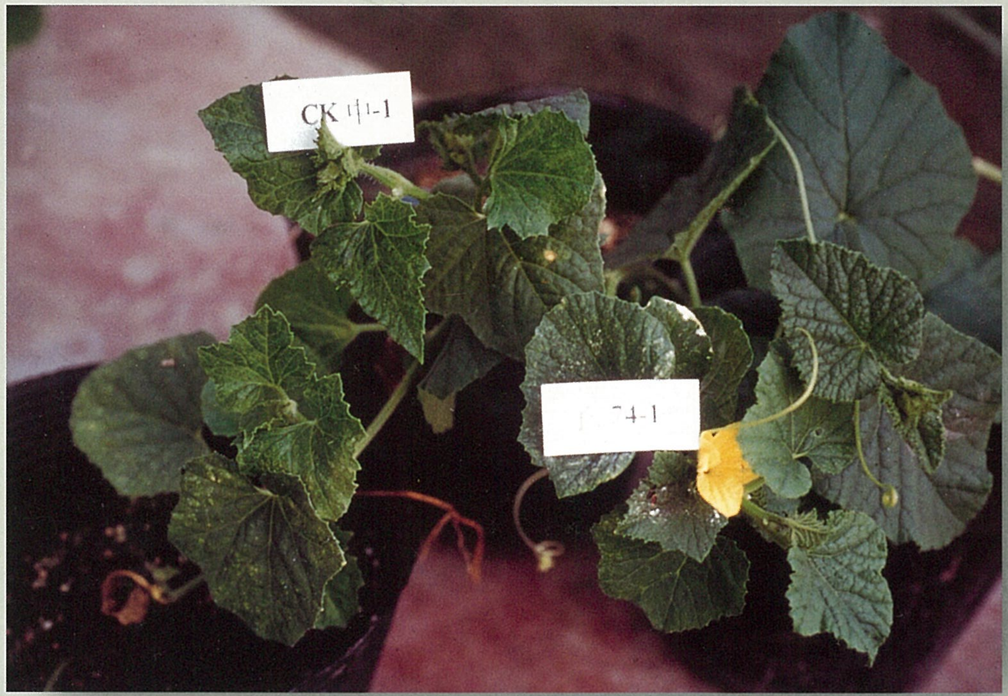
統一編號
030858880010



■經接種胡瓜嵌紋病毒(CMV)的抗(耐)病瓜

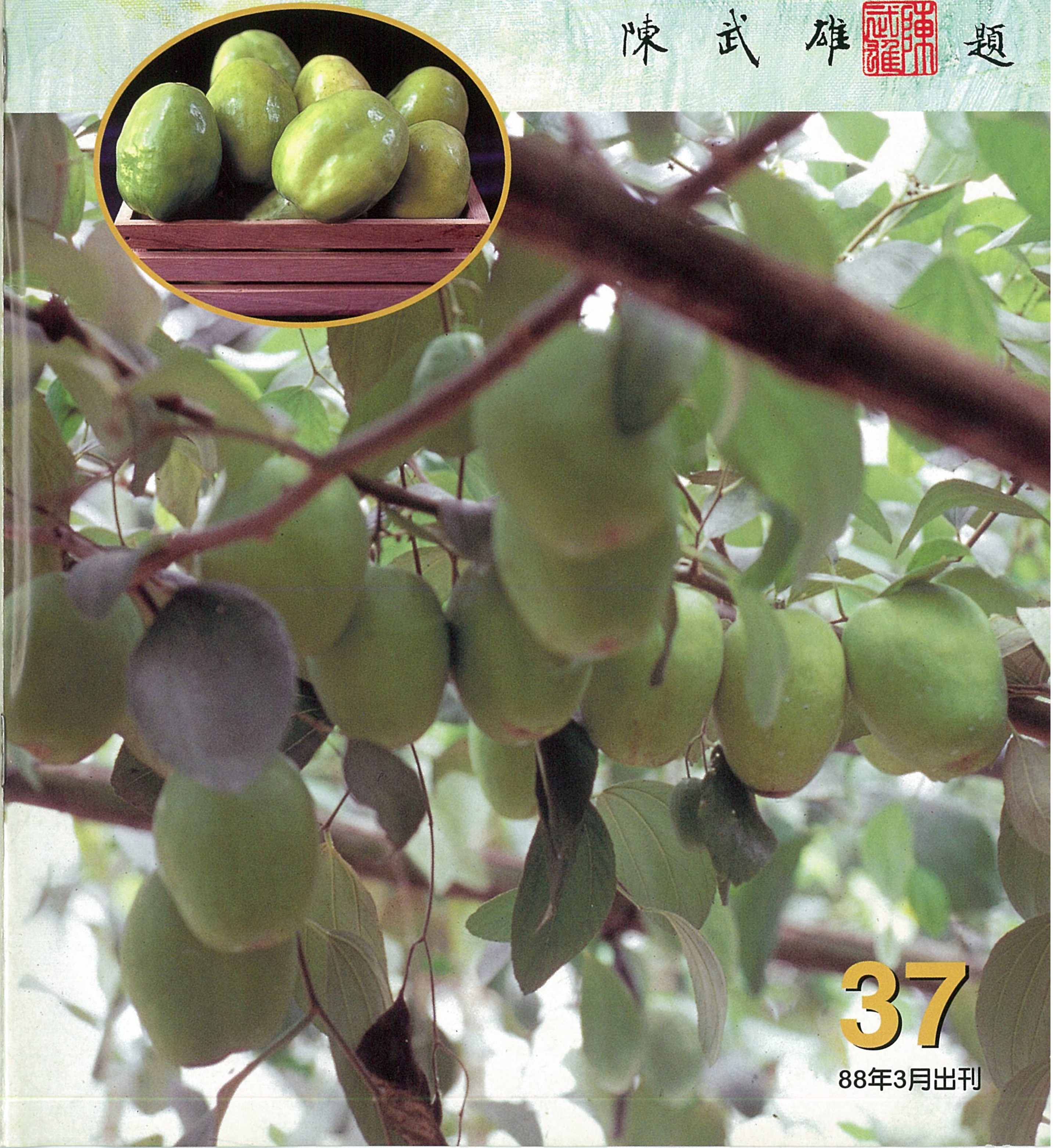
瓜類抗病毒之基因轉殖

胡瓜嵌紋病毒 (Cucumber Mosaic Virus, CMV) 為本省甜瓜重要病毒之一，尚無理想抗病親本，故難以傳統育種育成抗病品種。本所與中興大學合作，應用基因工程技術將該病毒之鞘蛋白基因(coat protein gene, cp gene) 選殖後，藉由農桿菌媒介法將基因轉入甜瓜中。目前轉殖材料經組織培養並以kanamycin初步篩選，已獲得4個具有抗或耐CMV株系，並進一步予以自交。目前播種之3個株系的自交後代中，有10-20% 仍具有抗或耐CMV能力。此一基因轉殖育種方式為近年來生物科技的一大突破，本所利用此項新技術，預期可以育成新的瓜類抗病品種，供農民種植。

台灣省農業試驗所
ISSN 1017-0863

技術服務

陳武雄 題



37
88年3月出刊

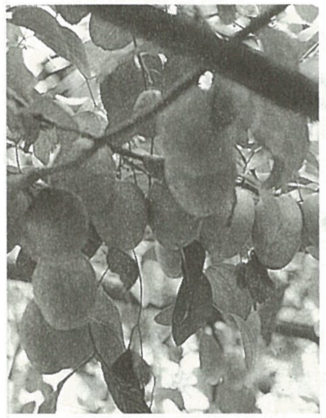
保健植物之開發與利用(一)

小葉山葡萄：為本省原生植物，台南縣為主要栽培地區。整個植株包括根、莖、葉、花、果均可利用，其性清涼，以鮮草或乾草為材料，本所已研製成爽口略帶酸味之細葉山葡萄茶飲料，風評甚佳，頗具未來市場潛力。

劍葉桔香草：台灣自1980年開始才有零星種植，目前在台南、屏東等縣有較大規模之栽植。劍葉桔香草具有保健效用，為本所目前積極開發之保健植物。萃取之葉汁具有芋頭香味，可做為大眾化食品或飲料之添加劑。利用葉片製成易開罐之桔香草茶飲料已上市，甚獲消費者好評。劍葉桔香草樹型佳，常年青綠，亦可開發為高價值的觀賞盆栽植物。

第十卷第一期
中華民國八十八年三月出版

目 錄



封面說明

本所新育成印度棗新品種「台農一號」具果實碩大、肉質細脆多汁、風味佳及貯售性佳等特性，目前已正式命名並推介農民採用。

照片提供：鳳山分所　張麗華

發 行 人／林 俊 義
總 編 輯／廖 慶 樑
編　　審／技術服務季刊編審委員會
執行編輯／楊舜臣、陳盈佑
出 版 者／台灣省農業試驗所
台中縣霧峰鄉萬豐村中正路189號
電話：(04)3302301
網址：WWW.TARI.GOV.TW
行政院新聞局出版事業登記證局版
臺省誌字第二八八號
中華郵政中台字第〇七五九號
執照登記為雜誌交寄
印 刷 者／秋雨印刷股份有限公司
台南市中華西路一段77號
(06)2613121～7

〈專題報導〉
02 省政不打烊，施政不中斷一趟主席守博就職致辭全文

〈植物保護〉
04 聚合酶連鎖反應在農業昆蟲鑑定上的應用 —— 張淑貞

〈植物保護〉
07 楊桃細菌斑點病之病因探討及防治成果 —— 蔡志濃、安寶貞、許秀惠、林俊義

〈農業化學〉
11 本省農田土壤裂化問題之檢討與改進 —— 朱戩良、劉滄棽、劉禎祺、江志峰

〈農業統計〉
17 農業試驗設計及統計分析諮詢服務之十年績效及展望 —— 魏夢麗、呂椿棠、呂秀英

〈作物種原〉
21 淺談AFLP分子標幟種原遺傳歧異分析與品種鑑定的新寵兒 —— 陳 述、范明仁

專題報導

省政不打烊，施政不中斷

—趙主席守博就職致辭全文

◎技術服務室　彙整

今天，守博以及江副主任、全體省府委員暨陳祕書長就職，承蒙　院長親自前來主持佈達並監誓，各位貴賓、長輩、鄉親和同仁蒞臨觀禮、鼓勵，內心至感榮幸。謹此表達最誠摯的感謝之意。

「臺灣省政府功能業務與組織調整暫行條例」於今天正式生效施行。省政府功能業務與組織的調整，是我們啟動國家整體政府再造工程的第一步，是政府再造工程的火車頭。任務充滿挑戰也具有關鍵性的影響。　總統與院長將主持此一工程的重責大任，交付給我，首先我要感謝　總統和　院長對我的期許、厚愛和信賴。我一定全力以赴。我更誠懇盼望所有省府同仁，大家開誠佈公、精誠團結、攜手同心一起來完成此一具有深刻歷史意義的使命，大家共同來充當並做好推動政府再造、強化行政效能和提升國家競爭力的參與者、見證者和貢獻者。

從今天開始，臺灣省政府的功能、地位和組織，進入了一個新的階段，在此省府改制重新出發的新舊交替時刻，我特別要對光復以來所有在歷任省主席領導下為省政建設奉獻過心力的先進和同仁們，表達我無限的欽佩；他們的辛勞、努力和貢獻是締造台灣奇蹟、成就現在中華民國進步繁榮的重要動力。而過去近五年多來，省政府在宋省長的帶領下積極推動各項建設的優異表現，我也要表示個人的敬意。

精省政策是國家的一項重大創新和改革，它的發動和決定，靠的是大刀闊斧的魄力與決心；現在要具體落實此一重大的改革，則應憑藉小針密縫的耐力和細心。因此，我將以臨深履薄的心情，來面對我的新任務。今後，省政的推動和省府功能業務與組織的調整，我將多聽取省府同仁的意見和心聲，多與行政院相關部會及考試院協調溝通，也多尊重縣市地方的看法。務期以平和漸進的方式，順利達成　李總統所提示的「提高政府行政效率、創造人民更大福祉」的政府再造的終極目標。

在此，我要重申維護省府員工同仁權益的堅定立場。　李總統、連副總統及蕭院長都一再表示，再精省作業中，要盡一切力量來確保省府同仁合法、合理的工作權益。我將秉持此一原則，並依據「臺灣省政府功能業務與組織調整暫行條例」有關保障員工權益的規定，來推動精省的工作。省府同仁是國家寶貴的行政人力資源，一定會受到應有的珍惜和重視，在未來省府組織、功能業務調整的過程中，也一定會獲得妥適的安置和運用。我深信，經過調整之後，大家繼續在工作崗位上努力奉獻，一定可以在個人事業的發展上，峰迴路轉、柳暗花明，再創亮麗的第二春。

從今天開始，政府再造的列車，就要在省政府正式啟動，從今天起的省政府，就像是一部重新自我改造，而同時又必須繼續向前開動行駛的車輛。因此，應該繼續推動的省政建設，一定不可中斷。省府所有既定的施政方針和預算，尤其是涉及人民福祉和安全的施政，我都要和省府同仁按原定計畫時程推動，更要配合行政院「 政府再造」、「經濟振興及升級」及「社會重建」的三大施政主軸，結合地方，在行政院的領導下，共同為邁向國家全面現代化而努力、奮鬥。

民國六十五年，我以一個三十出頭的青年，受到當時省主席　謝東閔先生的拔擢，進入省政府服務，一直到七十六年方始離開到中央。我的青春歲月可以說是大多是在省府度過的。對於省政府的一人一事、一草一木，我都懷有深厚的感情。這次奉派再回省府服務，能夠與老朋友、老同事再度共事，自然感到欣慰。不過，許多當年一起為省政工作打拼奮鬥的同事、朋友，有的已不在人間、有的則已退休。而我也已逾知天命之年，不再是當時最年輕的廳處長了，再想到我此次所擔負的任務性質和它的嚴肅性、重要性，此刻我內心真是百感交集。我衷心懇求　院長、中央相關部會首長和同仁、各位地方首長、各位鄉親、友好、長輩、先進，特別是全體省府工作同仁，今後多給我指導、支持，讓我及省府同仁可以共同合作，完成我們所擔負的使命和任務。

最後，敬祝大家新年快樂、萬事如意，謝謝。

植物保護

聚合酶連鎖反應

在農業昆蟲鑑定上的應用

◎農試所應動系 張淑貞

聚合酶連鎖反應的應用原理

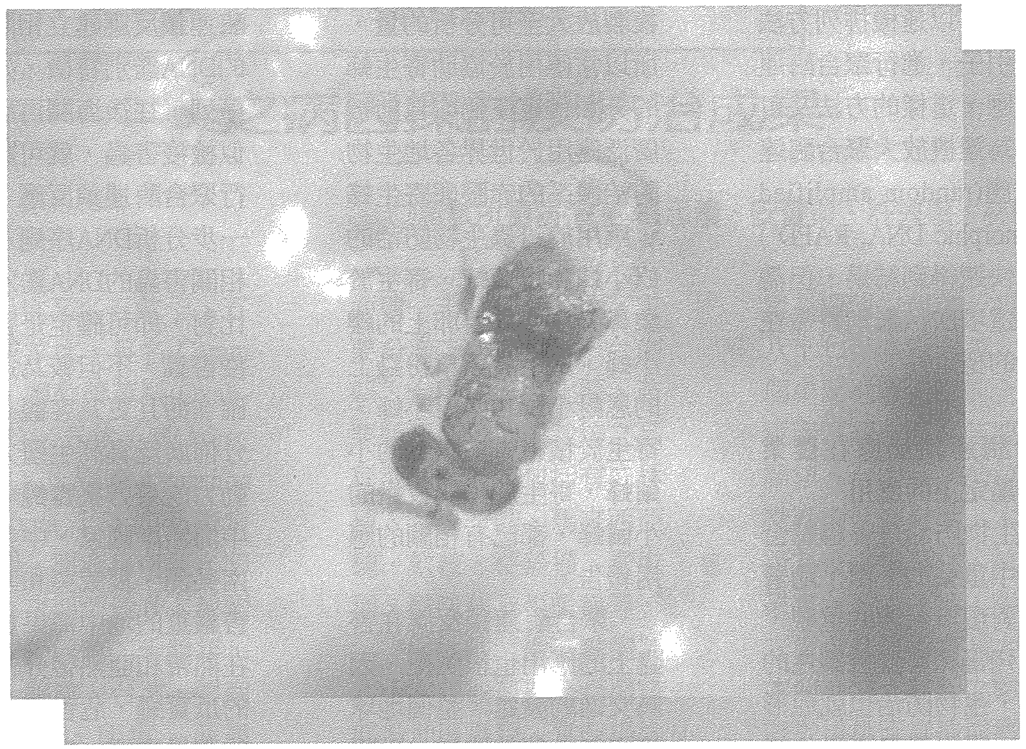
1985年Karry Mullis 發表聚合酶連鎖反應(polymerase chain reaction, PCR)，廣受各界注目，接下來短短四年內，世界各地相關於聚合酶連鎖反應的報告就超過一千份，而Karry Mullis 也因為他在聚合酶連鎖反應方面的成就，獲得1993年的諾貝爾化學獎。因為聚合酶連鎖反應準確、迅速的特質，隨之也被大量應用於昆蟲分類、鑑定上，尤其是傳統分類不易分辨或鑑定程序較複雜耗時的昆蟲。

聚合酶連鎖反應的主要目地是以已知上、下游序列的DNA當引子，將特定的少量DNA在細胞外以2n的速率快速複製放大成較多量，而得以進一步研究分析。而DNA是遺傳因子的本體，有時在複製時會產生錯誤，有些錯誤因不嚴重影響生物的基本生命功能，而會被留下來繼續傳給下一代，於是在漫長的演化中逐漸累積變異，而留在各種不同的生物中。換言之，掌管生物生命基本功能的DNA，較不會累積變異，因為這個部分的錯誤很可能使生物無法進行正常的生命功能而致死亡，這項錯誤也就無法傳給下一代。所以這個部分的DNA演化速率較慢，在各種生物間的相似度較高。例如負責細胞內蛋白質製造的核糖體，在DNA層次上是以核糖體RNA字碼區(rRNA coding region)和非字碼區(non-coding region)組合而成，如圖一。

其中核糖體RNA字碼區將來會轉錄成核糖體的一部分，執行細胞製造蛋白質的生命基本功能，演化速率較慢，在各生物間的相似性較高，非字碼區則無意義，在接下來的過程會被剪掉丟棄。所以可

圖一

核糖體RNA字碼區	非字碼區	核糖體RNA字碼區
→ 引子		← 引子



玉米螟赤眼卵蜂

用其他生物已知的核糖體RNA字碼區，設計上、下游兩個引子，經聚合酶連鎖反應放大中間變異較大的非字碼區。例如臺灣常用於玉米螟生物防治的玉米螟赤眼卵蜂，和常用於蔗螟生物防治的蔗螟赤眼卵蜂，二者外形相似，體形微小，大約只有0.1公分，無法用肉眼分辨，經聚合酶連鎖反應放大中間變異較大的非字碼區，經電泳染色後，大小差異明顯，可分別鑑定出這兩種蜂。另外根據每一種限制酶只在一段特定的DNA序列剪切的原理，將聚合酶連鎖反應放大後的DNA產物再經不同的限制酶剪切，而因為不同種蟲DNA序列不同，或存有某一特定限制酶切位，或切位位置不同，切下的DNA片段大小也就不同，而得以建立不同種蟲的獨特限制酶圖譜 (restriction fragment length polymorphism, RFLP)。或者可將聚合酶連鎖反應放大的DNA產物，再經DNA定序的工作，亦可再經比對、研究DNA序列後，設計具種特異性的引子，則以後只要單純的進行聚合酶連鎖反應，就可知道是那種蟲，但這個方法需事先建立完整資料且經審慎實驗後才可使用。在未知生物DNA序列

前，也可以逢機排列方法設計引子，進行聚合酶連鎖反應，這樣的方法又可另稱為逢機放大聚合酶連鎖反應(random amplified polymorphic DNA, RAPD ），可快速得到結果，但需注意這項DNA鑑別特徵在種內的穩定性。

聚合酶連鎖反應在農業昆蟲鑑定上的應用

生物防治是害蟲綜合防治中重要的一環，隨著公眾對環境保護的重視，農藥殘毒和害蟲抗藥性的發生，生物防治也就愈形重要。寄生蜂是害蟲生物防治體系的重要成員，不同種寄生蜂對寄主的專一性、偏好性不同，有些同種內的不同生物小種對寄主的專一性、偏好性也可能不同，所以選擇正確的蜂種，其實是生物防治成功的主要因素。而寄生蜂一般體形微小，不易以傳統分類的方法鑑別，生物小種的分辨尤其更為困難，聚合酶連鎖反應可反應出遺傳因子本體一 DNA的差異，且極為敏感，只需極少量的DNA就可將之複製放大至可分析的量，所以常應用於協助寄生蜂的分類鑑定。例如目前被廣泛應用於世界各地生物防治體系的赤眼卵寄生蜂，應用於蚜蟲生物防治的蚜小蜂和蚜繭蜂，寄生於象鼻蟲和半翅目卵上的纓小蜂，寄生於煙草粉蝨上的恩蚜小蜂和槳蚜小蜂，寄生於積穀害蟲螟蛾的小繭蜂，寄生於田間夜蛾的小繭蜂，都已有相關的應用報告。

聚合酶連鎖反應在害蟲上的應用也很廣泛，因為交通的發達，整個地球被視為一個地球村，而隨著世界貿易組織的成立，各國間的貨物往來越來越頻繁，檢疫害蟲的問題也就越來越受各界的關切，而一般昆蟲的傳統分類鑑定都是以成蟲期的特徵為主，但在海關進口貨物中，除了成蟲外，還常常可以看到幼蟲，所以正確迅速的鑑定幼蟲種類非常重要。而因為DNA是遺傳因子的本體，不會因蟲期的不同而改變，所以可在事前以傳統分類的方法鑑別相關害蟲，再據此以聚合酶連鎖反應建立相關害蟲的DNA鑑別特徵，如DNA序列，往後海關再碰到疑似檢疫害蟲，就可將之進行聚合酶連鎖反應，或進一步分析DNA序列，再與相關害蟲的DNA鑑別特徵比對，即可確定是否為檢疫害蟲，不但較為迅速準確，而且更為客觀。例如分佈廣泛具高生殖力、移動力的東方果實蠅，在地中海沿岸國家、中美洲、南美洲、夏威夷和澳洲危害嚴重的地中海果實蠅，在熱帶和亞熱帶分佈普遍的瓜實蠅，危害許多果樹的蘋果實蠅、櫻桃實蠅、胡桃實蠅，園藝作物重要害蟲的煙草粉蝨和銀葉粉蝨，屬於倉儲害蟲的皮蠹和穀螟，危害許多作物的蚜蟲。另外聚合酶連鎖反應在上也已有相關的研究報告。

結論

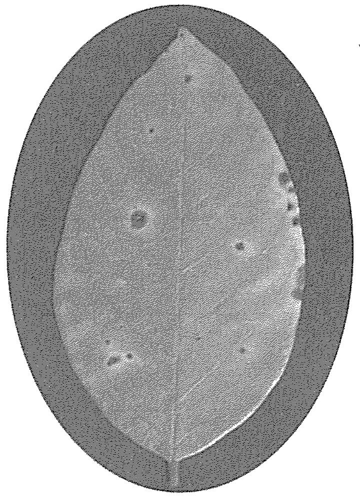
總之，因為聚合酶連鎖反應準確迅速的特質，在鑑定應用上已占有舉足輕重的角色，在農業昆蟲鑑定上也甚具發展潛能，值得各界重視。

楊桃細菌性斑點病
之病因探討及防治成果

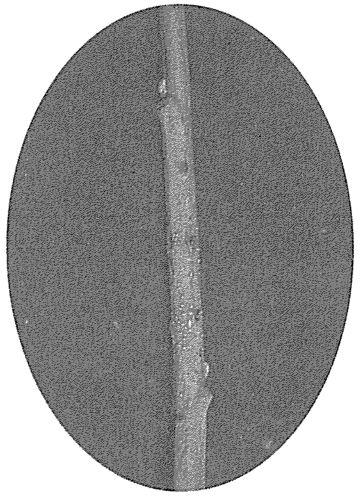
◎農試所植病系　蔡志濃、安寶貞、許秀惠、林俊義

楊桃又名五斂子、五稜子或羊桃，英名 Caram-bola，屬酢漿草科(Oxalidaceae），五斂子屬(Averrhoa L.)，學名*Averrhoa carambola* L.，為熱帶常綠果樹，原產東南亞，印尼及馬來西亞最多。我國栽培歷史已有二千餘年，廣東、福建、台灣、雲南均有種植。印度、菲律賓、巴西也有生產，巴西尤多，據傳係葡萄牙人自我國引入巴西。本省栽培面積一千八佰餘公頃，主要分佈於屏東縣、台南縣、台中縣、彰化縣、苗栗縣及南投縣，栽培之品種種類繁多，包括有二林種、台農一號、馬來西亞種、軟枝、秤錘種、青埔種、酸味種及歪尾種等。

楊桃細菌性斑點病為八十六年於苗栗縣卓蘭鎮部份地區發現，當時楊桃樹葉片黃化且落葉相當嚴重，經本所採回之標本分離、鏡檢及接種試驗，確定為細菌引起之新病害，八十七年本病則擴大為整個卓蘭地區，目前全省楊桃產區調查僅在苗栗縣卓蘭鎮、台中縣東勢鎮及南投縣國姓鄉發生，本病菌可為害楊桃葉片、枝條及果實，造成落葉，對楊桃之產量品質影響甚大，且本病有擴大蔓延之慮，恐將對楊桃產業造成嚴重為害，因此本所緊急進行室內對本病之防治藥劑篩選，並進行田間委託試驗，



圖一　細菌性斑點病葉片上病徵



圖二　細菌性斑點病枝條上病徵

圖三　細菌性斑點病果實病徵

目前已審查通過五種藥劑包括85%鹼性氯氧化銅可濕性粉劑300倍、68.8%多保鏈黴素可濕性粉劑1000倍、73%鋅-波爾可濕性粉劑800倍、4-4式波爾多液及40%銅快得寧可濕性粉劑500倍，可有效防治本病害。

二、病原菌及病徵

本病由*Pseudomonas syringae* pv. sp.引起。會為害葉片、枝條及果實，葉片上病斑初期為紅色針狀小點，漸漸擴大為直徑3-4mm之圓形病斑，病斑外圍為紅色，中間顏色漸漸轉為暗紅色，病斑周圍會產生黃色暈環(圖一)，由於病原菌分泌毒素，造成葉片黃化，嚴重時更產生落葉；枝條上之病徵，初期為紅褐色凸起之斑點，後病斑逐漸拉長呈橢圓形或條狀(圖二)；果實上之病斑初為凹陷斑點，黑褐色，棱角部亦會發生，逐漸擴展為圓形或不規則病斑，幼果感染則易造成果實畸型(圖三)，甚至落果。

三、發生生態

本病害於全年皆可發生，病原菌可存活於楊桃枝葉及果實中，罹病之枝葉及果實即為病害發生之主要感染源，藉由雨水及風傳播，由氣孔及傷口侵入感染，楊桃修剪枝條後及在春雨、梅雨期及颱風季節，為本病最易傳播之季節。

四、防治方法

(一)田間衛生：病原菌能存活於田間罹病枝葉及果實，因此定期清除燒燬田間罹病枝葉及果實以減少感染源。

(二)年度採收後至整枝修剪期(約2-6月)，此時期又遇上春雨及梅雨期，會加速病害之傳播，此時期應進行預防性施藥。

(三)每次修剪及颱風過後，應加強施藥防治。

(四)藥劑防治：任選下表一種藥劑防治。

藥劑名稱	稀釋倍數(倍)	施藥方法	注意事項
85%鹼性氯氧化銅	300倍	每隔7天施藥一次，連續4次。	1. 定期清除罹病枝葉及果實。 2. 雨季來臨前，宜進行預防性施藥。
68.8%多保鏈黴素可濕性粉劑	1000倍	每隔7天施藥一次，連續4次。	同上
4-4式波爾多液	500倍	每隔7天施藥一次，連續4次。	同上
40%銅快得寧混合可濕性粉劑	500倍	每隔7天施藥一次，連續4次。	同上
73%鋅-波爾可濕性粉劑	800倍	每隔7天施藥一次，連續4次。	同上

臺灣百合之種子發芽行為

◎農試所農藝系　楊純明　李裕娟

臺灣百合，學名Lilium formosamum Wallace，為臺灣本地原產之百合科百合屬五種植物之一，其餘四種分別為小葉臺灣百合(L.formosanum Wall.var microphyllum,為臺灣百合之變種)、野小百合(L.callosum,又名細葉卷丹)、粗莖麝香百合(L. longiflorum,又名鐵砲百合)、及豔紅鹿子百合(L.speciosum,又名鹿子百合)。臺灣百合散見臺灣地區各地，從平地至海拔3000公尺高山、由南往北均見蹤跡，分佈廣泛，呈現不同外觀形態族群。由於臺灣百合具有(一)基因變異豐富而形態差異大，(二)自交親合性強易建立同質族群，(三)種子易發芽且播種後一年內可開花(早熟)，(四)植株生長勢強、鱗莖年內可達一定周徑，及(五)耐熱性強、自然花期6-9月等五種特性，若經適當雜交選拔，將可育出適合臺灣本地栽植之優良商用切花品種。

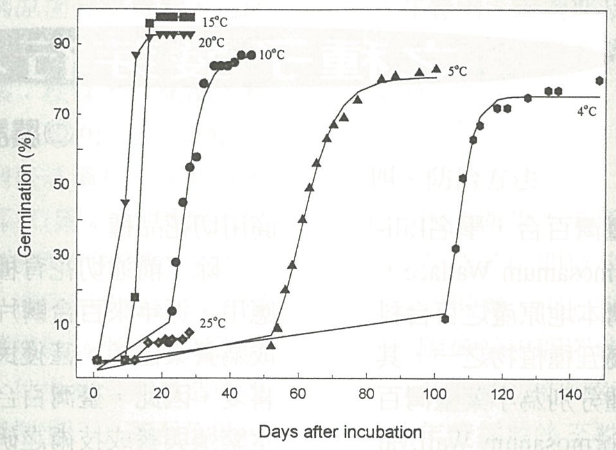
除了前述切花育種之應用，近年來百合鱗片亦成為餐桌佳餚，甚獲民眾喜愛。因此，臺灣百合鱗莖繁殖與養成技術之研發有其商業價值與需要，也較以往更獲重視。臺灣百合的稔實率高達60%以上，種子豐產、發芽容易，故以種子繁殖下一代量產鱗莖具有經濟利益。然針對臺灣百合種子發芽行為之研究，國內並不多見，本篇報告主要為作者近年試驗結果並加入部份國內相關文獻，期以提供各界參採。

從臺灣百合種子的廣泛分佈事實，顯見種子發芽較不受限於介質種類。作者以濾紙(Whatman No. 1)、蛭石(No3,South Seavermiculite & perlite Co.,LTD.,Taiwan)、泥炭土(TKS2 Instant ,Floragard ,Germany)、及蛭石-泥炭土混合物1:1，v/v)等四種介質進行發芽試驗，發現種子在4-25°C範圍內皆可發芽(資料未列出)，而且發芽行為在各介質之間類似，驗證臺灣百合種子對於發芽介質的廣適性。換言之，在水分供應無虞下，臺灣百合種子可在多樣介質上發芽、符合臺灣地區生態現況。無論岩磐、砂礫、土壤、或腐植質，在海邊、平地、沙丘、或山崖，均可發現群集生長之臺灣百合。

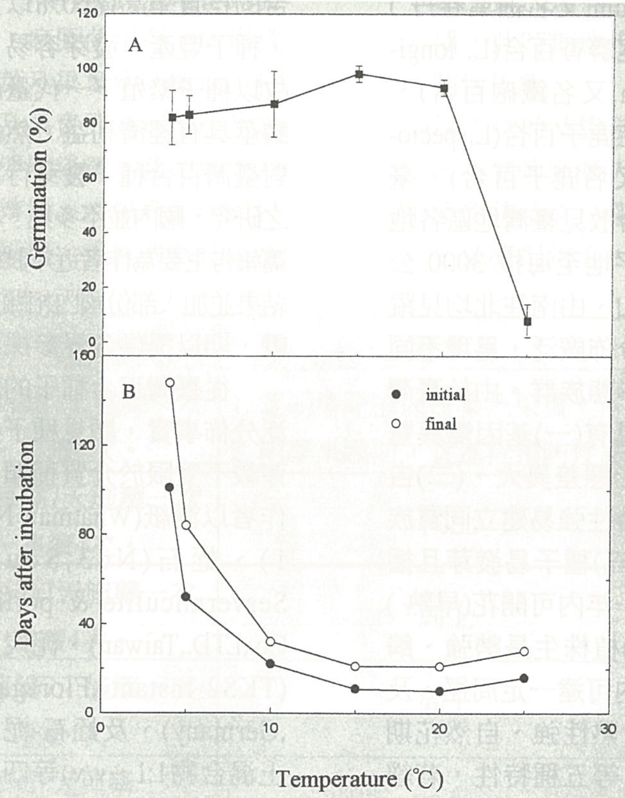
惟溫度影響臺灣百合種子之發芽行為，由圖一顯示(以濾紙介質為例)，黑暗中不同溫度之發芽速率及最終累積發芽百分比並不一致。在15及20°C定溫時，種子發芽速率最高，且在2週內達最大發芽百分比。隨著溫度之下降，發芽速率減緩，最大發芽百分比所需時間亦延長。當溫度上升至25°C時，累積發芽百分比顯著降低，僅及8%。而當溫度升至30°C，則無任何種子發芽(資料未列出)。由圖二(A)之累積發芽百分

比曲線，更清楚顯示臺灣百合種子發芽極限受溫度之限制，當溫度高於20° C將大幅減少種子發芽數。另一方面，溫度高於4° C則可明顯降低發芽所需時間(圖二(B))，尤其當溫度高於10° C時，起始及最終發芽所需時間顯著下降。

顯然的，臺灣百合種子發芽的溫度範圍甚廣，因此除了炎熱的夏季，臺灣地區幾乎全年皆容許臺灣百合發芽。此一特性亦支持臺灣百合植株常年分佈的事實，從窪地至高山、南至北，臺灣百合處處可見。再加上其鱗莖的無性繁殖能力，臺灣百合確有『春風吹又生』的強桿本錢。圖一又顯示，臺灣百合種子累積發芽百分比曲線適用logistic函數，在4-25° C間均可以此一函數模式分析與預測。此結果賦予臺灣百合以種子繁殖的經濟價值，在種子豐產及高種子發芽百分比條件下，不僅適合種苗大量生產，也適用於種苗自動化生產系統。惟在構建種苗一貫化生產體系之前，有關種苗的栽培介質、養分供給、及生長氣象環境等，仍待試驗探討與建立。



圖一 台灣百合種子以濾紙為介質在不同溫度下之累積發芽百分比曲線適用於logistic 函數表示



圖二 台灣百合種子以濾紙為介質在不同溫度下之累積發芽百分比及初始與最終發芽所需時間

本省農田土壤劣化問題之檢討與改進

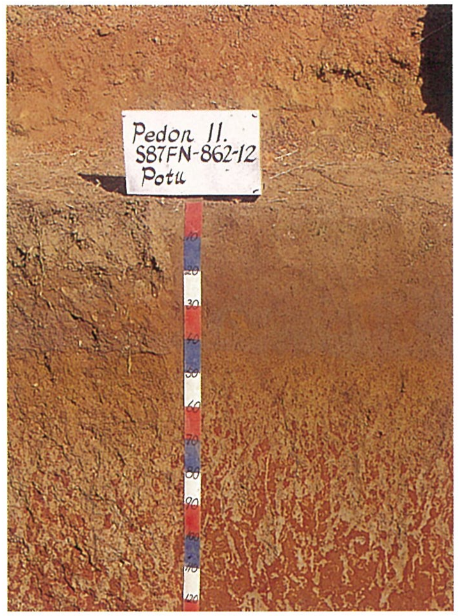
◎農試所農化系 郭鴻裕 朱戩良 劉滄棽 劉禎祺 江志峰

根據聯合國糧農組織於一九七九年之報告，將土壤劣化種類歸類為：水蝕、風蝕、鹽害、土壤化學性退化、生物性退化等。並認為土壤劣化之後果，包括：作物產量減少、增大農業投資、降低土壤產值或土地流失、水庫河川、灌溉渠之淤積、增加水患、水資源流失、養殖業損失、影響人體健康及生活品質受損等等，其影響相當廣泛，被視為是全球性之大問題。在一九八四年之估計全世界每年約有50至70億公頃（約佔世界農地0.3%至0.5%）之可耕地因土壤劣化而損失，推測至公元兩千年將擴大至100億公頃之農地損失。

美國學者Lal等人近年將土壤劣化定義為：因為人類對於土壤之誤用，導致土壤品質之退化。換言之即是土壤劣化乃是因為利用土壤而損及目前及未來土壤性質或利用潛能，導土壤之土壤生產力降低(質或量之降低)。Lal等人並將土壤劣化分為三方面，包括：土壤物理性退化、土壤化學性退化及土壤生物性退化等。土壤物理性退化問題又包括：土壤密實與土壤結皮、土壤磚紅壤化、沖蝕（ 水蝕與風蝕）與砂漠化；土壤化學性問題包括：肥力之流失與養分不平衡（土壤酸化、土壤鹽鹼化與有毒物質之加入）；土壤生物性問題包括：土壤有機質

圖一、20至40公分深之犁底層相當密實，阻礙大部分根系伸展

圖二、大雨後造成之土壤結皮，影響發芽率與土壤通氣性



圖三、北部地區紅壤之聚鐵網紋層 (plinthite)

之減少與土壤大型與微生物之減少等。

本文試借其論點，闡述並檢討本省之農田土壤劣化之生成環境與部分改進研究之結果，概略分述如下：

一、土壤物理性劣化

（一）土壤密實

土壤之密實乃是因為耕犁層下之土壤之構造孔隙被破壞或減少所造成。近年因為對於農業機械倚靠殷切，同時農業機械發展大型化，以增加效率，但亦因巨型機械碾壓而使得土壤產生犁底層。

本省農田因水田耕作多年，因人畜或機械在浸水環境下耕犁行走；或因本省春、夏多雨環境，農民搶農時而在土壤濕度太高之情況下耕犁，極易產生犁底層，使土壤密實。多年來之調查資料顯示，本省農田土壤之密實情形普遍而明顯，一般旱作之根系很少深入18公分以下，尤其是稍粘重之土壤，對於旱作作物產量影響很大，尤其在乾旱或多雨之情況，可以明顯感受土壤密實之影響。同時，因為在坡地之土壤密實而導致土壤沖蝕或水分逕流之損失，或因土壤密實而影響肥料肥效、灌溉效率或增大蒸發散量及作物易罹病害等不利之效應。

省農試所及各區農改場之歷年田間試驗研究或小規模之推廣試驗資料，顯示因深耕或潛耕對於玉米、香蕉、花生等作物之增產有10至20%之效果，依田間土壤之密實程度、耕作期之氣候與田間灌排水設施而定。國外之資料亦顯示，作物因曾土壤密實而導致農作物減產25至50%，或增加耕犁燃料費達35%。

（二）土壤結皮

土壤結皮是因雨滴之衝擊地表土壤，形成厚度約為1公厘之膠結表皮；另一種為因地表之微小物質洗入孔隙中而減低孔隙率，形成厚度3公厘結皮。形成土壤結皮之原因有三：(1)雨滴之衝擊，(2)因雨水淋洗而使得土壤溶液之電解質濃度低，(3)缺乏土壤基質而使得黏粒或細小物質易於分散或移動。

圖四、西南部沿海地層下陷區產生之土壤濕害，無法栽植作物

圖五、設施過量施肥導致土壤鹽分累積，引起非洲菊生長障礙

本省因為農田土壤以坋質壤土為主，位處亞熱帶使得農田土壤有機質含量不高，故土壤膠結力不足，一次耕犁土塊太大，可是多次耕犁後土壤又變成碎土；加以春雨及夏日多驟雨，雨滴大而衝擊力大，或是農田採用漫灌，水分蒸散後，土壤易於結皮，對於春、秋作作物之發芽率影響甚大，甚至需要再次播種，影響農時尤以雙子葉作物影響更大。土壤結皮之現象亦頗為普遍，因為本省水旱田輪作制度已久，中、南部砂頁岩區土壤有機質含量不豐，土壤質地又多為坋質壤土，土壤結皮現象普遍。在農試所試驗田之坋質壤土田區觀查試驗，對於大豆之出芽率影響可達40至75%，玉米之發芽率亦在10至30%之間，推測原因除土壤性質外，因土壤有機質含量低及水旱田輪作之因素亦使得本項問題明顯。為解決本項土壤問題，農試所過去在轉作政策實施期間曾研發夏季田菁中間作不整地栽培玉米去克服，成果良好；一般亦有不整地栽培較整地栽培產量豐產之試驗結果，但需視土壤與氣候條件而定。

（三）磚紅壤化

磚紅壤化與紅壤化經常被某些土壤學家混淆，磚紅壤化是因土壤中之鐵、鋁氧化物聚集化，並膠結成像鐵石般之硬塊。換言之，磚紅壤化是一種土壤物理性與化學性皆差之土壤劣化產物。本省之紅壤面積約有150,000公頃農田，分為水旱田兩種耕作制度，但產生磚紅壤化土壤系發生於水田利用或有地下水之田區，主要集中於桃竹地區，其對於水旱田之生產皆有不利之影響，對於旱作之影響較大

。根據近年在桃園地區進行之土壤調查工作發現當地之土壤由於石門水庫完成後由旱田轉為水田，其土壤剖面內部亦開始產生磚紅壤化之跡象，惟尚不嚴重；在三芝之調查發現當地之紅壤因水田栽種已有數百年之久，故在磚紅壤化現象已明顯，但發生於剖面底層，程度上尚不影響農耕。在桃園臺地地勢低之地區，由於地下水文之影響，許多磚紅壤化土壤產生，影響剖面內部排水，對於某些旱作生產影響甚大。

磚紅壤化對於本省農業生產之影響並無立即性之威脅，但對於土地利用之限制確明顯存在。但如果因土壤沖蝕或土地重劃將表土推移而使得聚鐵網紋（plinthite）出露，經乾燥後將嚴重限制耕作，需預為防範。此外土地利用或耕作制度亦會影響磚紅壤化之進行，應由長期之眼光妥為規劃此區之土地利用，但目前甚少對此主題進行研究。

（四）土壤沖蝕

土壤沖蝕即是土壤受水、風力之影響而搬離流失之作用，造成珍貴的表層土壤有機質、養分損失而使得生產力低落。本省因有水土保持局、林務局等專責機構負責本項業務，同時大家亦清楚水土保持之重要性，不在此多作討論。土壤沖蝕全部問題之癥結僅在有無落實水土保持之工作。此外，本省沿海地區之風蝕嚴重，防風林及荒蕪田區之管理不可忽視。

（五）土壤過濕

土壤過濕，土壤孔隙大都為水所充滿，並將土壤空氣排出土體外，或土體與大氣間之氣體交換無法完成之危害。土壤過溼，根圈環境缺氧，使得根系不能生長或生長不良，對於生產有嚴重之影響。

本省農田土壤過濕之產生原因有許多，包括：(1)過多之降雨或洪水產生短期之濕害。由於全球氣候變遷之效應以及社區、工廠、道路的擴張、坡地之開發，洪水危害頻率增加，造成許多農田易於遭受過濕之危害。本省之養殖業、工廠大量利用地下水，但另一方面因水田轉作、農田轉用為社區、工廠及道路等因素，使得地下水補注不足，造成宜蘭及西南部沿海地區之地層下陷，部分地區農田經常遭浸水而無法耕作。因為地層下陷之農田常轉為魚塭地，故其遭為害面積甚難估計。(2)灌溉或地層下陷導致地下水位提高之濕害。在水旱作混栽及沿海地層下陷區發生。(3)因耕犁壓實土壤產生之濕害。常在較黏土壤發生，主要為農民在不恰當之土壤水分狀態下耕犁或遇雨搶收作物。(4)不當的公路或社區建設，阻擋地表排水。土壤過濕除了因根系缺養造成作物生長不良外，在地層含鹽分區，常因地下水位高而使得鹽分上昇至地表而造成鹽害。

二、土壤化學性劣化

（一）養分流失或養分不平衡

土壤養分流失通指因農田表土沖蝕、土壤養分淋洗下滲、土壤有機物分解等事實，造成土體中提供作物養分量減少，影響作物之生產。此處專指土壤中鹽基之損失，土壤養分之流失可能因為灌溉、施肥及土壤之自然化育而產生。雨水、灌溉水中含有氫離子，可能與土體中之鹽基替換，造成養分下移；或是水田耕作，產生之氧化還原作用，使得鐵、錳離子下移，造成退化水田或鐵錳聚積層等；化學肥料之施用產生之硝化作用產生之氫離子會促成土壤鹽基之替換而損失，同樣有機肥之分解與硝化作用同樣的亦產生酸根，使土壤鹽基流失；有時有機肥會改善土壤酸化現象，乃是因有機肥製作過成加入一些石灰物質之故。如果施用化學肥料同時亦注重鹽基之補充，本項問題可以減輕許多。許多之園藝作物田施用過多之磷肥，殘留於表土，會阻礙其它養分之吸收，產生養分不平衡之現象。

在過去之土壤調查發現許多中、粗質地之酸性農田，其表土之交換性鹽基下移現象明顯，本省又處於高溫多雨之地區，推測本項土壤劣化之現象，普遍存在中、粗質地之酸性農田。養分不平衡區除上述之園藝作物田外，許多灌溉水含有石灰物質之農田，常因農田富含鈣質而與其它養分產生頡抗作用，造成養分之不平衡，此項問題普遍存於彰化、嘉南沿海區及花蓮縣北部農田。

（二）土壤酸化

土壤酸化為眾所認為土壤劣化之主要証據，土壤酸化是種自然現象，人類之施肥及工業產生之酸雨加速土壤之酸化。土壤酸化在中、酸性土會造成鹽基之淋失，對於作物生長不利，但在本省沿海鹼性土地區反而有利。土壤酸化很容易以施用石灰物質改善，過去已有很多之試驗研究成果，而且施用石灰物質是一很普遍之土壤管理方法，只是在本省過去栽植水稻之環境並不需要此項措施，目前改為旱作、園藝作物等則對於此項問題必需重新重視。

一般人常將本省土壤之酸性分佈與土壤酸化混為一談，本省因處亞熱帶及受古氣候之影響，許多土壤屬於酸性是延續舊有環境所造成，與現今施用肥料或酸雨等產生之土壤酸化現象應有所區別。

（三）土壤有機質分解

土壤有機質對於土壤理化性質有其貢獻，如果土壤有機質分解將造成土壤養分之損失、土壤保肥力、保水力降低及土壤構造崩解、土壤生化活性降低等。土壤有機物分解對於作物產量影響之重要性自古為農藝家所重視，但由土壤養分觀點分析並無其特殊之處。許多國內外之長期施用有機質肥料與化學肥料之比較試驗亦証明此項觀點，但由全球氣候變遷與能源之節用觀之，關心土壤有機物之分解與否是重要的。

一般認為施用化學肥料會加速土壤有機質之分解，但在英國洛桑試驗場與省農試所之四十年長期試驗皆証明施用化學肥料之試區其土壤有機質含量雖低於施用有機肥區，但高於不施用肥料區。由此可知施用肥料並不減低土壤有機質含量。

（四）土壤污染

土壤承受外來之有機或無機物質致使影響作物生產，稱之土壤污染。本省工商業發達，許多工廠特別是染料與電鍍工廠散

佈農田間或灌溉水渠旁，如其排放水未妥善處理，廢水極易流入田區造成土壤污染，不但對於作物生產有影響，對於人體或家畜健康影響亦大，如滲入地下水中危害更大。

本省之土壤污染調查環保署已有調查，一般位於輕工業發達地區之農田遭受重金屬污染較多，有零星地區遭受有機物質如：油脂類之污染，對於農作物品質與產量會有影響。本省土壤污染之另一隱憂是來至禽畜糞堆肥之重金屬，一般認為有機質肥料是最佳之肥料，但經省農試所與各縣市政府之抽樣調查資料顯示，部分市售有機質肥料之重金屬含量偏高問題是不容忽視，應加強品質管制。

（五）土壤鹽化

土壤鹽化是土壤累積大量鹽分，造成高滲透壓，使作物生長不良。因為本省沿海地區地層下陷，經常有海水倒灌之事發生，使得土壤遭受海水侵入，土壤鹽化而無法耕作。另部分地區土壤剖面富含鹽分，過去因為以水田耕作為主，將鹽分壓制於底層，近年則因為水田轉作、乾旱停灌或地層下陷導致地下水位上昇，使得土壤鹽分回復地面而影響耕作。部分設施園藝區，因施用大量肥料並缺少淋洗措施，使得地表累積鹽分，作物種子發芽率降低或作物生長不良。本省之土壤鹽化問題以沿海地區之海水倒灌影響面積較大，後二者之影響面積較小。

三、土壤生物性劣化

（一）土壤有機物減少

土壤有機物為土壤中生物之主要能量來源之一，土壤有機物之多寡影響土壤生物之生存量與活動性。土壤有機物之重要性已在土壤化學性劣化提過，但亦有人將土壤有機質減少歸於土壤生物性劣化。在本省有關土壤有機物與土壤生物性之關係之研究目前才起步，尚無完整之資料。

（二）土壤大型與微生物之減少

土壤大型生物與微生物對於土壤元素之循環、分解有機殘體與廢棄物、污染物質之去毒作用、土壤病菌之頡抗作用等相當重要。因此土壤生物之數量與歧異度之變化被視為土壤品質之優劣，如果土壤生物量減少自然對於上述之作用有所影響，直接或間接對於作物生產或環境有不利之作用。雖然目前尚無良好方法可以完整測數土壤之生物量與種類，但是許多推測之方法如：呼吸量、土壤酵素、氧化還原速率等可以間接量測某些特殊作用之微生物量。

土壤生物減少之原因很多，包括：施用農藥、殺草劑對於大型生物與微生物之量或土壤呼吸量抑制，施用含氨之肥料抑制硝化作用或施用大量動物糞尿增加亞硝酸離子之積累等，土壤遭受重金屬污染對於土壤呼吸量亦有抑制現象。土壤生物量之監測亦為目前新興之學門，本省甚少資料完整討論本項主題，但有關本省蚯蚓之數量變化或農藥對某些微生物數量之影響等有許多報告，農試所已開始著手農田土壤品質監測，應再加強土壤生物性之監測項目。

農業試驗設計及統計分析諮詢服務之十年績效及展望

◎農試所農藝系　魏夢麗、呂椿棠、呂秀英

試驗設計與生物統計為現代農業研究所必需，為提高試驗研究之效率與水準，本所在民國66年遷於現址後，即在農藝系的編制下成立了試驗統計研究室，專司試驗設計與生物統計研究，同時也提供本所及其他農業研究單位之統計分析諮詢服務，並協助推動農業資訊之系統化與電腦化。目前試驗統計室有副研究員一名及助理兩名，在有限的人力下，仍然不斷有創新且實用的農業統計方法之研究成果發表，並針對各類農業試驗計畫，協助本所各系同仁及農林廳所屬各農業試驗場所解決有關試驗設計、資料分析及結果解釋等問題。

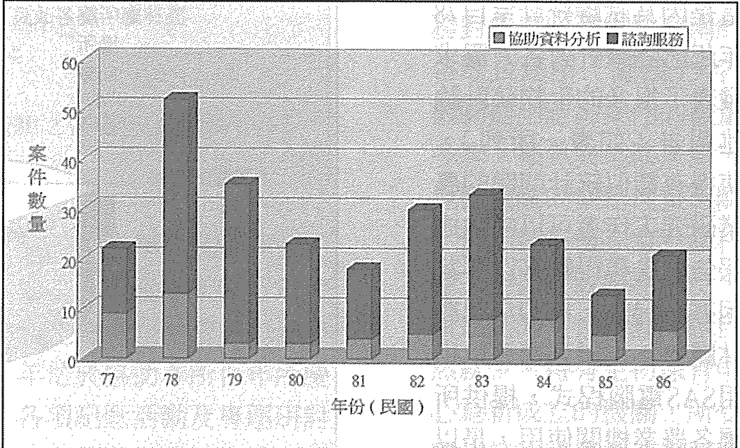
「農業試驗設計及統計分析諮詢服務」為試驗統計研究室的重要任務之一。服務項目有：

(1) 提供現有電腦設備及程式，以協助本所同仁進行資料分析。

(2) 受理各方有關試驗設計及生物統計之諮詢案件。

(3) 針對並綜合歸納諮詢者所提出的問題及需求，發表統計論述報告或開發統計分析程式及資料系統。

從民國77年4月起到民國86年12月底，這十年來每年所受理的諮詢服務案件數量如圖一所示。統計情形之所以從民國77年4月開始，是因為現任試驗統計研究室主持人呂秀英博士在77年4月上旬到任後即就服務案件作完整的記錄，包含現場及書面諮詢案件，但電話詢問案件則並未納入。由圖一顯示，78年所受理案件最多而高達52件，其後每年至少維持在13～38件之間。



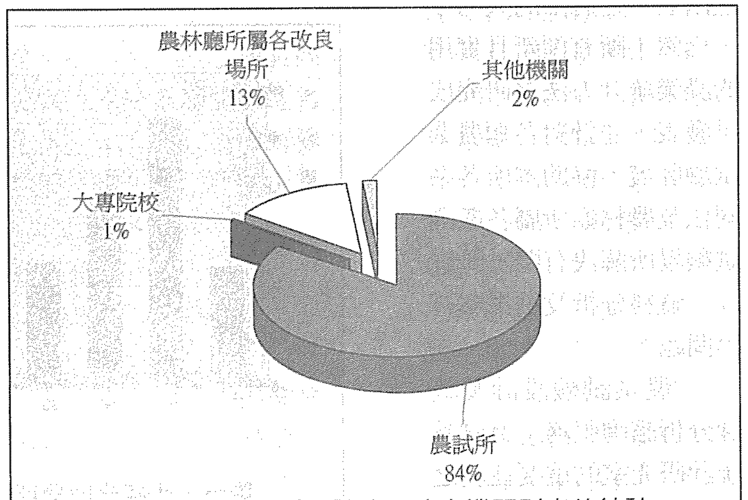
圖一、十年來所受理諮詢服務之年度別案件統計

表一、已發表之生物統計論述報告

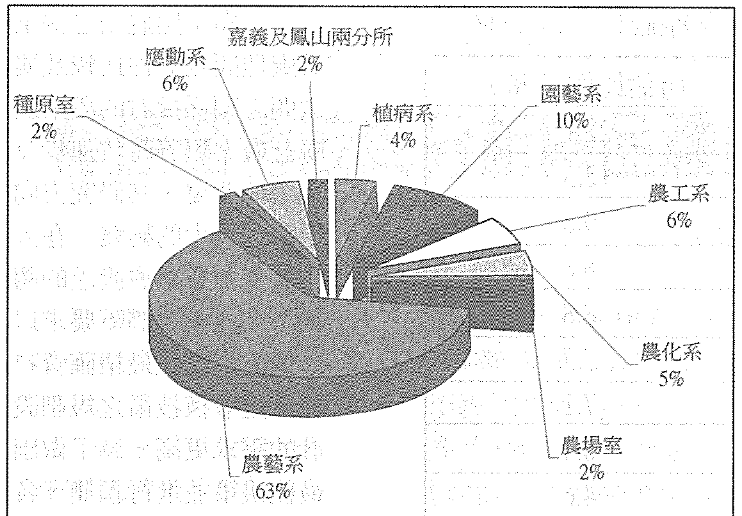
主　　題	年度	發表刊物
穩定性分析	1988	科學農業 36(11-12):333-339
農學與統計.一、農學家與統計工作者	1989	科學農業 37(5-6):157-161
農學與統計.二、資料處理	1989	科學農業 37(7-8):204-209
農學與統計.三、設計與分析	1989	科學農業 37(9-10):250-256
農學與統計.四、頻度資料	1990	科學農業 38(5-6):148-155
農學與統計.五、資料轉換	1990	科學農業 38(7-8):182-187
農學與統計.六、迴歸與變積分析	1990	科學農業 38(11-12):321-331
多重比較方法之使用與誤用	1990	科學農業 38(7-8):177-181
作物基因型與環境交感	1990	園藝作物育種講習專刊 :141-149.台灣省農業試驗所編印.
全互交的理論及分析	1991	科學農業 39(3-4):71-80
田間試區取樣	1992	科學農業 40(9-10):356-367
試驗設計常見的濫用及誤用	1993	科學農業 41(11-12):177-186
作物模式化的意義及展望	1997	臺灣農業 33(3):95-114
處理平均值間之差異也可以用圖示表達	1997	農業試驗所技術服務季刊 8(4):20-23.
綜合變方分析的正確使用	1997	臺灣農業 46(3-4):146-155.
試驗設計的正確使用	1997	特用作物試驗成果研討會專刊:49-59.台灣省農業試驗所編印.

這是因為試驗統計室自78年起已陸續針對各方需求發表了很多的生物統計論述報告（如表一所列），使得有類似統計問題的農業研究工作者可以由論述報告中先尋得解答以解其困惑。另外，自79年起農林廳每年均編列預算以租用SAS電腦程式，提供所屬各農業機關使用，是以大多數農業研究者都可以自行處理一些較為簡單的統計分析，需要協助資料分析的案件也就變得較少，但對於電腦程式輸出報表的結果解釋之諮詢案件反而增多了。要特別注意的是，80～81年間由於試驗統計室奉命負責規劃、推動及開發本所的行政管理整體資訊系統，以及85年忙於協助本所百年所慶各項紀念活動及專題研討會之籌辦，雖然人力不足又必須全力投入所方交辦工作，仍竭盡所能地服務同仁以解決各種統計問題。

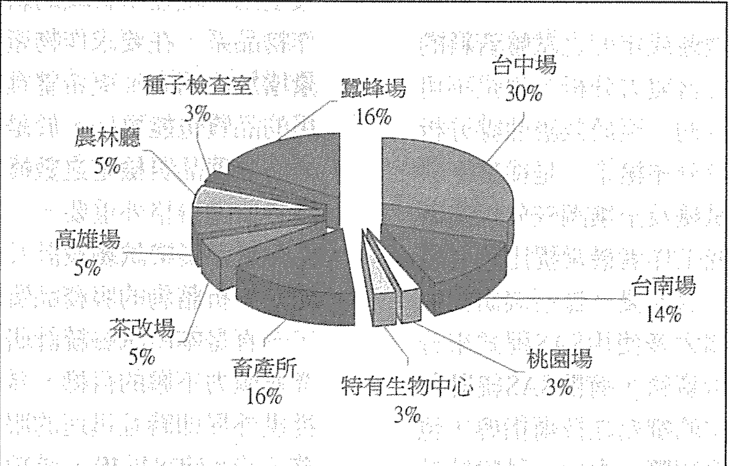
十年來所受理案件中的服務對象，由於地緣便利的關係，還是以本所同仁為主，如圖二之機關別服務案件統計情形，本所同仁約佔84%，而農林廳其他改良場佔13%，其他還有大專院校和其他機關（如海外會、亞洲蔬菜中心、香蕉研究所、菸葉試驗所等）。本所同仁中則又以農藝系來請教問題及要求協助資料分析者為最多，佔6成以上，其次為園藝系，除了本所技術服務室及農經系以外，幾乎所有系室的同仁都曾提出諮詢服務（圖三）。至於農林廳所屬機關中，則服務對象更涵蓋從北到南的各改良場所（圖四）。各機關提出諮詢案件的數量多寡，顯然與地緣無關，但與機關的業務性質有關，例如種子檢查室及農林廳主要為行政服務單位，所遇到的生物統計問題自然就少。特有生物保育中心為新成立的機關，所受理的諮詢服務案件主要開始於這兩、三年。



圖二、十年來所受理諮詢服務之機關別案件統計



圖三、十年來受理本所同仁諮詢服務之單位別案件統計



圖四、十年來受理農林廳所屬機關之各場所（除本所外）案件統計

表二、十年來理諮詢服務案件中前十名統計方法排行榜

名次	統計方法類別	所佔比例（%）
1	變方分析	22.1
2	試驗設計	12.3
3	迴歸與相關	9.8
4	多重比較方法	8.8
5	數量遺傳	8.8
6	穩定性分析	7.7
7	綜合變方分析	7.1
8	SAS統計程式撰寫	6.4
9	效應曲線分析	4.6
10	分布檢定	4.0

表二所列為各方所提出諮詢的統計方法前十名排行榜。由於各類農業研究計畫，都應該在試驗執行之前作妥當的田間佈置與設計規劃，當資料收集後大多得進行變方分析及比較處理差異性，因此一般而言，農業研究工作者在試驗設計、變方分析及多重比較方法上所發生的問題自然較多。兩變數之間的關係探討，譬如迴歸與相關，也是常提出的問題。從事作物育種的同仁，則對有關數量遺傳之統計方法的需求較多。由於作物試驗常同時在好幾個地區執行或連續進行數年，因此有關如何合併數個地區或年度之試驗資料的綜合變方分析，也是不可少的。至於效應曲線分析及分布檢定，是從事肥料試驗及土壤調查分析的研究工作者最常提出的問題。目前農林廳所屬研究機關大多使用SAS程式來分析資料，有關SAS統計程式的撰寫之技術指導，也很頻繁。對此，試驗統計室即於83年發行「PC版SAS簡易操作手冊」（第二版），供各方免費索取。目前並有發行第三版的計畫，正在積極籌備中。有關取樣方法、官能檢定及模式建立的諮詢案件，雖然未列入前十名，但是在這一、兩年也開始增加了。此顯示出過去之偏重於處理間差異性比較及變數間之關係探討的農業試驗計畫，隨著時代進步及大環境改變，其研究方向正產生巨大的轉變。在人力及資源愈來愈匱乏的趨勢下，促使我們更要求以最低成本獲致最精確資料，於是取樣技術之規劃設計的需求更高。為了做出最佳決策並進行預測，各種作物模式之建立如春筍般生出。現在所育成的新作物品系，在要求作物產量增加之同時，更希望食用的品質也能更好，於是如何處理品質檢定之數據資料便顯得格外重要。

提昇農業試驗設計及統計分析諮詢的服務品質，一直是本所試驗統計研究室亟力不懈的目標。為提供外界即時且迅速的服務，自87年8月起，該項服務並已躍昇本所全球資訊網際網路(http: //www.tari.gov.tw)的便民服務項目之一。期望各方農業研究工作者能多多利用，試驗統計室將秉持一向的熱誠繼續服務大家，並發表更多的統計論述報告及技術手冊。

淺談AFLP分子標幟—

種原遺傳歧異分析與品種鑑定的新寵兒

◎農試所種原室　陳 述　范明仁

植物種原所具有的遺傳歧異是作物育種的原動力，因此成功的種原收集保存與育種計畫皆端賴對於物種遺傳歧異度的瞭解；而一旦育成了優良的品種，更應積極建立詳細的品種鑑定資料，一方面可以保障育種者的智慧財產權，另一方面則可作為種苗生產業者的品質管制之用。

無論是種原的遺傳歧異分析或是育成品種的鑑定技術，均可藉由外形性狀、遺傳基因之初級產物（如：蛋白質、同功異構酵素）與DNA分子標幟等各方面進行。由於DNA分子標幟具有不受環境影響、可利用的標幟數目多、以及可直接反映DNA序列的差異等優點，因此被認為是偵測種原遺傳歧異與進行品種鑑定的良好工具。

目前被大家所廣泛運用的DNA分子標幟包括: 1980年由Botstein等人所提出的”限制片段長度多型性“ (Restriction Fragment Length Polymorphism；RFLP)，1990年由Williams等人所提出的 “核酸逢機增殖多型性“ (Random Amplified Polymorphic DNA；RAPD)，以及1989年由Tautz所提出的“簡單序列重複”(Simple Sequence Repeat；SSR or microsatellite)。

其中RFLP是最早被利用的分子標幟，其缺點為分析流程太長，需耗費大量時間與人力，所須的樣品DNA量多，且在同一次分析中所能偵得的基因座較少；而之後所發展出的SSR與RAPD，係以聚合酵素連鎖反應為基礎(PCR-based)的分子標幟，因此相較於RFLP而言，分析過程變得快速簡單，且每次分析所可偵得的基因座較多。不過這兩種分子標幟也各有缺點，其中RAPD的缺點是對於試驗的反應條件相當敏感，因而導致了再現性低的問題；而SSR標幟的缺點為尋找這些簡單序列重複的基因座及發展專屬的核酸引子是相當耗時與昂貴的。因此，對於須要檢定大量樣品，以及累積大量具可靠性之多型性條帶，以進行後續統計辨認分析的種原遺傳歧異分析與品種鑑定研究而言，耗時、耗力與低再現性等問題始終是嘗試利用分子標幟進行種原遺傳歧異分析與品種鑑定研究者心中的痛！令人不禁引頸企盼著是否能夠尋找到一個可以較經濟的人力、時間與金錢，即能偵得相當多的基因座變異，且又具試驗再現性高的分子標幟！

1993年Zabeau等學者提出了一個新的DNA指紋

分析技術—增殖片段長度多型性(Amplified Fragment Length Polymorphism；AFLP)，取得了歐洲專利應用權(European Patent Application No.0534858)。1995年這群學者在著名的Nucleic Acid Research期刊上發表描述了這個新的DNA指紋分析技術的原理，此時AFLP便開始受到了全世界研究者的重視。而我們也一眼認出了AFLP正是那個引頸企盼多年的理想分子標幟，勢必成為未來進行種原遺傳歧異分析與品種鑑定的新寵兒!

AFLP到底有著什麼樣的魅力? 讓人如此這般著迷與奮不顧身的擠進它的懷抱呢? 因為它的主要特色是“快”、”再現性高”與“偵得條帶數目多”。而這樣的特色其實是源於其設計原理所造成！AFLP的基本原理為針對基因組內限制片段進行PCR增殖的技術（詳圖1），因此亦屬於以PCR反應為基礎的分子標幟，所以基本上承襲了PCR分析流程“快速”的特色;但就再現性而言，由於AFLP採取了RFLP原理的前半段，即首先以限制酵素將基因組切割成為限制片段，然後利用限制片段切口具有“專一辨認序列”的特點，做為在進行PCR反應時所使用的引子（pri-mer）設計上下功夫，使得引子在與DNA模板（即限制片段）復合時條件相當嚴格，因而提高了PCR結果的再現性，所以Za- beau等原創AFLP的學者稱AFLP是綜合了RFLP技術“可靠”（再現性高），以及PCR技術“快速高效率”的優點。之後許多研究學者都曾嘗試以實驗驗證AFLP是否確有著如Zabeau等學者所言之優點，結果多是正面的答案，其中規模最大的是1997年數個歐洲分生實驗室共同合作嘗試比較在同一種試驗操作步驟下，由各不同實驗室所作出的條帶圖譜是否一致，以瞭解於各實驗室間交換彙集試驗結果資料的可行性，參與比較的分子標幟包括RAPD、AFLP 與SSR，結果顯示AFLP再現性最高，來自於6個實驗室針對兩個甜菜品系，以2對引子組合進行AFLP分析所得的條帶圖譜中，僅其中一個實驗室有一條帶缺失，其餘結果均同，因此顯示就目前所採用的分子標幟而言，AFLP確實具有較高的再現性。最後，再就偵側遺傳歧異訊息的能力而言，許多研究報告也已証實利用AFLP分子標幟每次分析所可偵得的基因座數目，較以往所使用的RFLP、RAPD與SSR為多。而正由於AFLP這種可允許大數量的限制片段快速專一進行增殖的特色，因此可在短時間內快速檢定大量樣品與累積大量可靠的多型性條帶資料，這正是它的魅力所在。

前述曾提及AFLP是採用了RFLP原理的前半段，並在後續的引子設計上下了功夫，才得以提高再現性，以下便逐一作更詳盡的介紹。AFLP的主要步驟為（圖一）：

1. 雙酵素切割（double di-gestion）

首先將基因組DNA以兩種限制酵素進行切割(digestion)，以得到限制片段。

2. 轉接子之黏接（ligation of adapters）

在被切出的限制片段左右兩端各加上雙股的轉接子(adapter)，像兩個夾子一般地夾住限制片段，以作為後續進行PCR增殖時的模板DNA。而轉接子的特色是帶有前述所使用的限制酵素專一序列，因此才會與被切出的限制片段相黏接(ligation)。

3. PCR增殖（PCR amplifi-cation）

PCR增殖時所使用的引子是有特殊設計的，其5' 端為具有與前述轉接子相互補的序列，而3' 端才是任意的核甘酸延伸序列，因此可使得在進行PCR反應時，引子與DNA模板的復合條件較為嚴格，而提高PCR結果的再現性。而增殖程序分2階段進行，第一個增殖程序稱為前增殖(preamplification)，係於DNA模板兩端各放置帶有一個選擇性核甘酸延伸序列的引子所完成;第二個增殖程序稱為選擇性增殖(selective amplification)，係以帶有較長選擇性核甘酸延伸序列的引子來進行增殖反應。

4. 序列膠體電泳（sequen-cing gel electro- phoresis)

由於所得的被增殖片段很多，必須進行序列膠體電泳以偵測記錄結果。

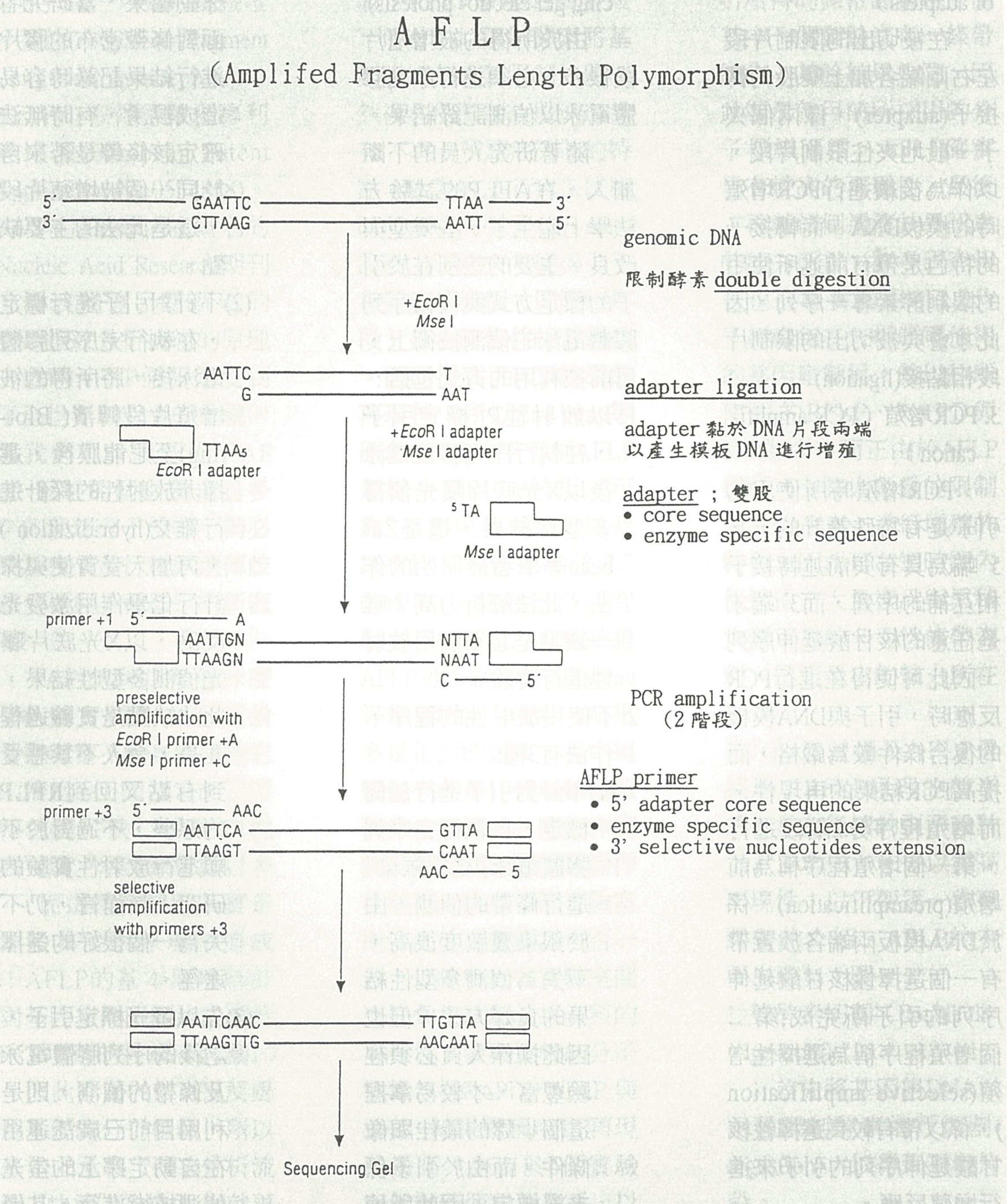
隨著研究人員的不斷加入，在AFLP的試驗方法學上產生了一些變型與改良，主要的差別在於引子的標定方式與後續序列膠體電泳的偵測技術上，目前被利用的方式包括：

1. 以放射性P^{32}標定引子，在執行序列膠體電泳後以X光底片曝光偵得多型性結果，這是Za-beau等學者最原始的作法，此法解析力高，唯一缺點是必須使用放射性進行實驗。
2. 不使用放射性的程序，作法有3種:

(1)不針對引子進行任何標定，在執行完序列膠體電泳後以”銀染”進行條帶的偵測，由於銀染靈敏度很高，不失為偵測多型性結果的良好方法，但也因此操作人員必須經驗豐富，才較易拿捏這個步驟的最佳顯像條件。而由於引子係未經標定，因此所偵得結果是雙股DNA的泳動結果，當研究者面對條帶密布的膠片進行結果記錄時容易造成混淆，有時無法確定該條帶是否來自於同一個被增殖片段，這是此法的主要缺點。

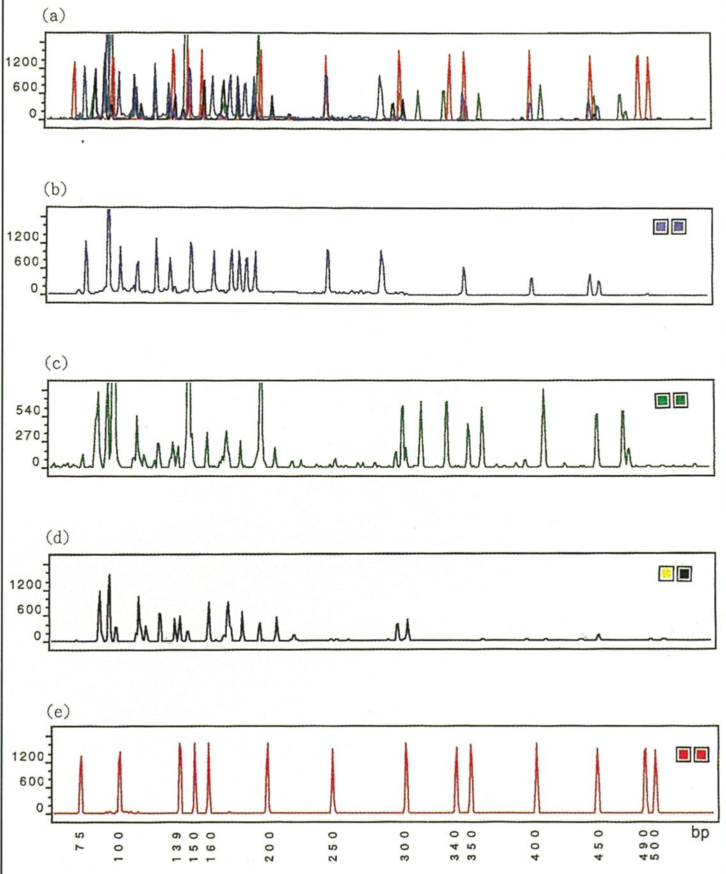
(2)不針對引子進行標定，在執行完序列膠體電泳後，將所得的被增殖片段轉漬(Blot-ting)至尼龍膜後，選擇非放射性的探針進行雜交(hybridization)，再加入受質使與探針行化學作用激發光反應，以X光底片曝光偵測多型性結果，此法缺點是實驗過程冗長，令人不禁感受到有點又回到RFLP的惡夢，不過對於不願進行放射性實驗的研究人員而言，仍不失為一個很好的選擇途徑。

(3)先以螢光標定引子，之後的序列膠體電泳及條帶的偵測，則是利用目前已廣泛運用在自動定序上的螢光偵測技術進行。其優點為經由不同顏色螢



圖一、AFLP分子標幟的試驗程序

光所標定的引子在各別完成AFLP的選擇性PCR增殖反應步驟後，其所得的增殖產物可加以混合以同時進行多型性之偵測(如圖二筆者所作的綠豆種原之例)，因此又減少了不少樣品分析所須的時間，對於AFLP有“如虎添翼”的效果，且不同批試驗樣品間結果比對的正確性較佳！唯所須儀器較為昂貴，但若就研究所耗之時間、人力與結果比對的正確性考量而言，此法仍是相當值得投資的。



圖二、綠豆"BOLANGER"種原以藍色、綠色、黃色（以黑色代表）螢光標定之引子，混合(a)或分別(b,c,d)進行AFLP多變形偵測之結果。其中紅色部份(a,e)為DNA分子量標記；圖示左方為訊號強度。

以上我們針對AFLP的原理與現行試驗技術的演進作了一些簡單的介紹。目前AFLP的旋風也已逐漸在台灣登陸，中研院、台大農藝系與本所等單位均已開始了相關的試驗研究工作與應用。根據筆者以往利用RFLP、RAPD分子標幟的經驗比較，以及近日在AFLP試驗上的親身體驗，AFLP分子標幟的確是一個“快”(快速)、“狠”(所偵得之條帶數目多)、“準”(專一再現性高)的研究好幫手，是種原歧異分析與品種鑑定工作的新寵兒！當然，它的魅力並不僅止於種原研究方面，對於遺傳連鎖圖譜的建立，以及後續鑑定基因與選殖的深入研究而言，其應用潛力極大，預期未來將會有更多的研究人員投入AFLP的陣營中。